

Sektion 34

Molekulare Phytomedizin

34-1 - Funktionelle Charakterisierung der viralen Proteinase des *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Functional characterization of the viral proteinase of Cherry leaf roll virus (CLRV)

Markus Rott, Carmen Büttner, Susanne von Barga

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland, Markus.Rott@agrar.hu-berlin.de

Nepoviren (Familie *Secoviridae*, Sanfacon *et al.*, 2009) besitzen zwei positiv orientierte einzelsträngige RNAs, die zu zwei Polyproteinen P1 und P2 translatiert werden. Das RNA1-kodierte P1 von *Cherry leaf roll virus* (CLRV, Nepovirus der Subgruppe C) beinhaltet charakteristische Domänen für einen Proteinase-Cofaktor (PCo), eine Helikase (Hel), ein genome-linked Protein (VPg), eine Proteinase (Pro) und eine RNA-abhängige Polymerase (Pol). P2 umfasst das movement Protein (MP) und das coat Protein (CP), sowie die Bereiche X3 und X4, denen noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (von Barga *et al.*, 2012).

Durch die virale Proteinase werden P1 und P2 an spezifischen Schnittstellen in ihre funktionellen Proteinuntereinheiten zerlegt. Dabei entstehen teilweise prozessierte Intermediate und vollständig prozessierte, reife Proteine, die verschiedene Aktivitäten haben können (Chisholm *et al.*, 2001). Der Regulation der Polyprotein-Prozessierung kann im Rahmen der Verbreitungs- und Vermehrungsstrategie des Virus eine essentielle Funktion zukommen.

Voraussetzung für die funktionale Charakterisierung viraler Genprodukte des CLRV ist die Aufklärung ihrer Prozessierung in die Untereinheiten. Die Analyse der Vollängensequenz zeigt potentielle Prozessierungsstellen für die Proteinase, die analog zu experimentell bestätigten Schnittstellen verwandter Nepoviren liegen (Wang und Sanfacon, 2000, Wetzel *et al.*, 2008).

Die putative Proteinase, sowie ein aus VPg und Proteinase bestehendes Vorläuferprotein wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und nativ gereinigt. Der die putative Schnittstelle zwischen X4 und MP umgebende Bereich des P2 wurde *in vitro* transkribiert und translatiert und für einen *in vitro*-Aktivitätstest als Substrat herangezogen. Die proteolytische Aktivität der Proteinase und des aus VPg und Proteinase bestehenden Vorläuferproteins konnte experimentell bestätigt werden. Die vorhergesagte Prozessierungsstelle zwischen X4 und MP wurde verifiziert. Durch die Etablierung dieses funktionellen Testsystems wird die experimentelle Überprüfung der weiteren putativen Prozessierungsorte sowohl von P1, als auch von P2 ermöglicht.

Literatur

- VON BARGEN, S., J. LANGER, J. ROBEL, A. RUMBOU, C. BÜTTNER, 2012: Complete nucleotide sequence of Cherry leaf roll virus (CLRV), a subgroup C nepovirus. *Virus Research* **163**, 678-683.
- CHISHOLM J., A. WIECZOREK, H. SANFACON, 2001: Expression and partial purification of recombinant tomato ringspot nepovirus 3C-like proteinase: comparison of the activity of the mature proteinase and the VPg-proteinase precursor. *Virus Research* **79**, 153-164.
- SANFACON H., J. WELINK, O. LE GALL, A. KARASEV, R. VAN DER VLUGT, T. WETZEL, 2009: Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology* **154**, 899-907.
- WANG A., H. SANFACON, 2000: Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein *in vitro*. *Journal of General Virology* **81**, 2771-2781.
- WETZEL T., J. CHISHOLM, A. BASSLER, H. SANFACON, 2008: Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* **375**, 159-169.

34-2 - Charakterisierung der Transportprotein- kodierenden Region des *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

Analysis of the putative movement protein- coding region of Cherry leaf roll virus (CLRV)

Luise Dierker, Susanne von Barga, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin, Lentzeallee 55/57, 14195 Berlin, Deutschland, Markus.Rott@agr.ar.hu-berlin.de

Das *Cherry leaf roll virus* (CLRV) der Gattung *Nepovirus* ist weltweit in einer Vielzahl krautiger und holziger Wirtspflanzenarten vertreten. Die natürliche Verbreitung kann vertikal durch Saatgut und horizontal durch Pollen erfolgen, so dass bei einer systemischen Ausbreitung des Virus in der Wirtspflanze auch die reproduktiven Organe infiziert sind. Die interzelluläre Ausbreitung des Virus innerhalb der Pflanze über Plasmodesmata erfolgt entlang tubulärer Strukturen die durch das Transportprotein gebildet werden. Der interzelluläre Transport von CLRV erfolgt als Partikel. Daher ist davon auszugehen, dass neben dem Transportprotein (MP, 385 aa, 42 kDa) auch das Hüllprotein (CP, 512 aa, 56 kDa) an der Ausbreitung in der Pflanze beteiligt ist. Das Transportprotein von CLRV gehört zur Familie der 30 K *movement*-Proteine und besitzt eine zentrale Domäne aus β -Faltblattelementen und α -Helices (Melcher, 2000). Innerhalb dieser Region weist das MP von CLRV ein konserviertes Prolin an Position 223 der Aminosäuresequenz auf, wie es für Transportproteine der Nepoviren charakteristisch ist (Mushegian et al., 1994). In dieser Arbeit wurden CLRV-Sequenzen von Transportprotein-kodierenden Bereichen von Isolaten verschiedener phylogenetischer Gruppen miteinander verglichen. Zudem wurde die Domänenstruktur der CLRV-MPs mit Hilfe verschiedener Computerprogramme analysiert. Basierend darauf wurden Deletionsmutanten des MP von CLRV aus Rhabarber hergestellt. Diese Mutanten wurden im Hefe Zwei-Hybrid-System (YTHS) eingesetzt, um funktionelle Bereiche des MP, die Protein-Interaktionsdomänen darstellen und u.a. zur Dimerisierung dieses Proteins beitragen, zu determinieren.

Literatur

MELCHER, U., 2005: The '30 K' superfamily of viral movement proteins. *J. Gen. Virol.* **81** (1), 257-266.

MUSHEGIAN, A. R., 1994: The putative movement domain encoded by nepovirus RNA-2 is conserved in all sequenced nepovirus. *Arch. Virol.* **135** (3-4), 437-441.

34-4 - Komparative Analysen der vollständigen Genome der *Acholeplasmataceae* zeigen grundlegende Unterschiede im Metabolismus und Virulenzfaktoren auf

*Comparative Analyses of the Complete Genomes of *Acholeplasmataceae* show Basic Differences in Metabolism and Virulence Factors*

Michael Kube, Christin Siewert, Sabine Holz, Bojan Duduk², Jelena Mitrovic², Erich Seemüller³, Richard Reinhardt⁴, Carmen Büttner

Humboldt-Universität zu Berlin, Fakultät für Lebenswissenschaften, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

²Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade/Serbia

³Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau

⁴Max Planck Genome Centre Cologne, Köln

Die *Acholeplasmataceae* umfassen das provisorische Taxon *Candidatus* Phytoplasma und *Acholeplasma*. Die Phytoplasmen sind mit Krankheiten in über eintausend Pflanzen assoziiert, während die saprophytischen *Acholeplasmen* nicht als primäre Pathogene charakterisiert sind. Für die Gattung *Acholeplasma* lag bisher nur die Genomsequenz von *A. laidlawii* vor. Um diese Informationslücke zu schließen, bestimmten wir vollständig die Genome von *A. palmarum* und *A. brassicae* via Sanger- und Pyrosequenzierung. Die zirkulären Chromosomen von *A. palmarum* und *A. brassicae*

weisen eine Länge von 1,6 Mb (G + C 29%) und 1,9 Mb (G + C 36%) auf und kodieren 1,439 und 1,690 Proteine. Phytoplasma-Genome grenzen sich durch zahlreiche horizontale Gentransferereignisse, Rearrangements und Genduplikationen grundlegend von den Acholeplasmen ab. Duplikationen sind auf die rRNA-Operons von *A. brassicae* beschränkt oder einzelne Gene wie das single stranded binding Protein (SsB). Im genetischen Repertoire der Acholeplasmen liegen zudem das Zellteilungsprotein FtsZ, der FOF1 ATP Synthetase- sowie der Rnf-Komplex, SecG, als auch eine vergleichsweise reichhaltige Ausstattung mit ABC Transportern und ein komplexer Kohlenhydratstoffwechsels vor. Komparative Analysen zeigen eine Genomkondensation in beiden Gattungen auf, sowie eine frühe evolutionäre Aufspaltung. Abseits des gemeinsamen Genpools ist das Fehlen von Schlüsselgenen der obligat parasitären Phytoplasmen in den Acholeplasmen hervorzuheben. Zu dieser Gruppe gehört die Kodierung wichtiger metabolischer Funktionen (z.B. Malatdehydrogenase), aber auch Funktionen der Pathogen-Wirt-Interaktion (Membranproteine, Effektoren).

Literatur

KUBE M, SIEWERT C, MIGDOLL AM, DUDUK B, HOLZ S, RABUS R, SEEMÜLLER E, MITROVIC J, MÜLLER I, BÜTTNER C, REINHARDT R., 2014: Analysis of the complete genomes of *Acholeplasma brassicae*, *A. palmae* and *A. laidlawii* and their comparison to the obligate parasites from 'Candidatus Phytoplasma'. J Mol Microbiol Biotechnol. **24**(1):19-36.

34-5 - Analyse von exprimierten Genen des phytopathogenen Bakteriums 'Candidatus Phytoplasma mali' zeigt wichtige Einblicke in Virulenz und Metabolismus

C. Siewert, T. Luge², B. Duduk³, E. Seemüller⁴, C. Büttner, S. Sauer² und M. Kube

Humboldt-Universität zu Berlin, Fakultät für Lebenswissenschaften, Albrecht Daniel Thaer-Institut für Agrar- und Gartenbauwissenschaften, Fachgebiet Phytomedizin

²Otto Warburg Laboratory, Max Planck Institute for Molecular Genetics, Berlin, Germany

³Institute of Pesticides and Environmental Protection, Serbia

⁴Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau

'Ca. *Phytoplasma mali*' ist ein phytopathogenes Bakterium der Familie Acholeplasmataceae und der Klasse Mollicutes. Es ist bekannt als Verursacher der Apfeltriebsucht, wobei es die Siebzellen kolonisiert und in der Folge eine Reihe von Symptomen auftreten, wie die Hexenbesenformation und die verminderte Fruchtgröße und -qualität. Dies führt in ganz Europa zu großen Ernteverlusten. Obwohl die Genomsequenz dieses Pathogen seit 2008 vorliegt, gibt es nur wenig Literatur zu einzelnen exprimierten Genen und bisher wenig Literatur zu einer ungerichteten Proteom- oder Transkriptionsanalyse dieser oder anderer Phytoplasma.

In dieser Arbeit wurde eine Illumina RNA-Seq zur Transkriptions- und Shotgun-Massenspektroskopie zur Proteomanalyse an einer mit 'Ca. *P. mali*' Stamm AT infizierten *Nicotiana occidentalis* Pflanze durchgeführt. Über 200 exprimierte Gene konnten identifiziert werden. Es wurden einige an der Pathogen-Wirt-Interaktion beteiligten exprimierte Gene identifiziert, wie ein lcmE-ähnliches Proteins (Sekretionssystem Typ IVB), ein SAP11-ähnliches Proteins welches als Effektor von Phytoplasmen bekannt ist, das Immunodominante Membranprotein Imp und einige HflB Proteasen und AAA+-ATPasen. Exprimierte Gene des Metabolismus zeigen, dass viele ABC-Transporter aktiv sind und ein alternativer Glykolyse Stoffwechselweg zur Gewinnung eines Moleküls ATP unter Verbrauch von Acetat wird aktiviert wird.

34-7 - Parallel sequencing of *Heterodera schachtii* transcriptome revealed pioneer putative effectors

Samer Habash, Abdelnaser Elashry, Florian M.W. Grundler

INRES Molecular Phytomedicine, University Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str.13, 53115 Bonn, Germany

Beet cyst nematode (BCN) *Heterodera schachtii* effectors are secretory proteins that are injected into the affected root cell in order to induce and maintain the syncytium (Wyss and Zunke, 1986; Grundler et.al.,1998). Many studies done to understand this interaction (Hewezi et.al.,2010). In our study, we aimed to understand more about plant-nematode interaction by identifying new nematode effectors. Comparing BCN transcriptome with available nematode ESTs resulted in the identification of 484 putative secretory proteins specific to plant-parasitic nematodes (P-PSP). We found that P-PSP datasets includes 24 sequences, which are supported by *H. schachtii* ESTs. Most of those pioneer putative effectors were not previously identified as PSP due to their partial sequences. Sequence validation of six putative effectors was done. Then the genes expression pattern study of showed that the expression of contig 45287 show no significant changes in the post-infective stages compared with the pre-infective J2s, while the other genes were up regulated in the post-infective stages in a range of 2 to 18 fold, which may indicate their role in the parasitism process (Figure1.A). Four of the upregulated contigs were localized within the esophageal gland (Figure.1B) by obtaining the in situ hybridization (de Boer, et. al. 1998). Further studies will be obtained on this PSPs to prove there importance in the parasitism prosedure, which giving a new mean of breeding programs against sugar beet cyst nematodes.

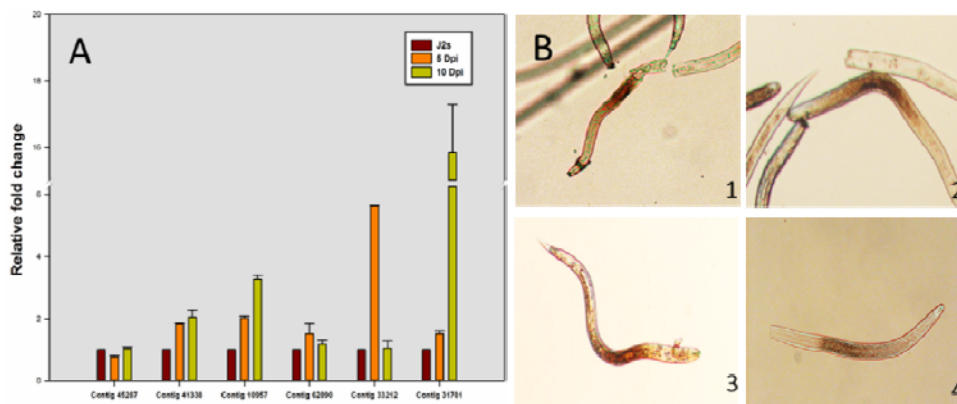


Fig. 1 A) The qPCR results testing the expression level of our genes of interest. (J2s) = second stage juveniles, 5 dpi = 5 days post inoculation, and 10 dpi = 10 days post inoculation. B) *in situ* hybridizations showing expression patterns of cDNAs encoding: (1) contig 31781, (2) contig 10957, (3) contig 62890, (4) contig 41338.

Literatur

- de Boer, J. M., Yan Y., Smart, G., Davis, E.L., Baum, T.G. (1998): In-situ Hybridization to Messenger RNA in *Heterodera glycines*. J Nematol. Sep 1998; 30(3): 309–312.
- Grundler, F. M. W., Sobczak, M., Golinowski, W. (1998): Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. European Journal of Plant Pathology 104, 545–551.
- Hewezi, T., Howe, P. J., Maier, T. R., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., Davis, E. L. and Baum, T. J. (2010): Arabidopsis Spermidine Synthase Is Targeted by an Effector Protein of the Cyst Nematode *Heterodera schachtii*. Plant Physiology, 152(2), 968-984.
- Wyss, U., Zunke, U. (1986): Observations on the behavior of second stage juveniles of *Heterodera schachtii* inside host roots. Revue nematol. 9, 153-156.

34-8 - Investigation of *H. schachtii* transcriptome identifying putative novel effectors and host partner proteins

Elashry Abdelnaser, Samer Habash, Nahal Ahmadinejad², Heiko Schoof², Florian M. W. Grundler²

INRES Molecular Phytomedicine, University Bonn, Karlrobert-Kreiten-Str.13, 53115 Bonn, Germany

²INRES Crop Bioinformatics, University Bonn, Katzenburgweg2, 53115 Bonn, Germany

Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, INRES Crop Bioinformatics

Beet cyst nematode *Heterodera schachtii* (BCN) is one of the biotrophic sedentary endoparasite nematodes, which depends on a specific, multinucleate, syncytial feeding structure. The nematode secretes effector proteins into the affected root cell in order to induce and maintain the syncytium. We analyzed BCN transcriptome aiming to identify its secretome and functionally annotate them based on their structure by having signal peptide and lacking a transmembrane domain. We identified nearly 500 sequences as putative secretory proteins specific to plant-parasitic nematodes (P-PSP). Among P-PSPs, We identified 24 PSPs supported by previously known *H. schachtii*. However, those ESTs were not identified, in many cases, as PSP due to their truncated sequence. On the other hand, we used the Biana Interlog Prediction server (BIPs) to identify putative interacting partners of *A. thaliana* (At_Partners) with our PSP (Garcia-Garcia *et al.*, 2012). We identified 40 proteins that are predicted to have a putative interacting protein partner(s) within *A. thaliana* (Figure 1). Confirming the nature of our genes of interest to be considered as PSPs, we analyzed their level of expression and localization by qPCR and in situ hybridization, respectively.

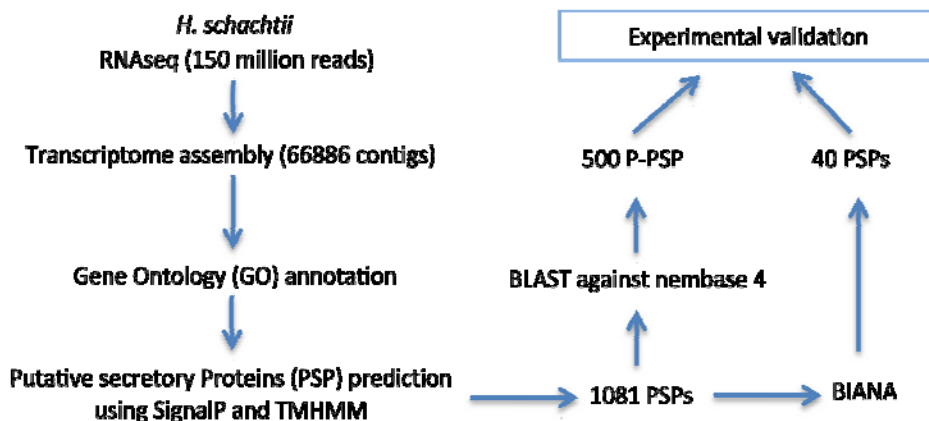


Figure 1. The scheme of the study showing the resulted portions of sequences Identified as PSP, P-PSP, and predicted interacting proteins. PSP=Putative Secretory Proteins, P-PSP=Phytonematodes-specific PSP.

Literatur

Garcia-Garcia, J., Schleker, S., Klein-Seetharaman, J., & Oliva, B. (2012). BIPs: BIANA Interlog Prediction Server. A tool for protein-protein interaction inference. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W147–51. doi:10.1093/nar/gks553